

12.7.2004

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 02 SEP 2004

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 8月20日

出願番号
Application Number: 特願2003-296216

[ST. 10/C]: [JP2003-296216]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構
愛知県
和光純薬工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋

【書類名】 特許願
【整理番号】 PS03-1308
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市名東区高針台2丁目804
 【氏名】 神奈木 玲児
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県瀬戸市白山町2-151
 【氏名】 井澤 峰子
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区平針黒石845 平針住宅六街区5
 【氏名】 村松 喬
【発明者】
 【住所又は居所】 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94121 サンフランシスコ19番街295-6
 【氏名】 内村 健治
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府吹田市千里丘西24-3 フォレストシティ千里丘C-8
 08
 【氏名】 細川 秀明
【特許出願人】
 【持分】 60/100
 【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【特許出願人】
 【持分】 20/100
 【識別番号】 000116622
 【氏名又は名称】 愛知県
【特許出願人】
 【持分】 20/100
 【識別番号】 000252300
 【氏名又は名称】 和光純薬工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100087631
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 滝田 清暉
【選任した代理人】
 【識別番号】 100110249
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 下田 昭
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 011017
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

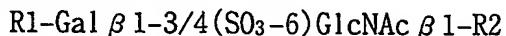
被検者の組織、体液若しくは糞便又はこれらの抽出物に対する抗体の反応性の有無又は反応強度を検査することから成る大腸癌及び大腸腺腫の検査方法であって、該抗体が、GlcNAc-6-硫酸基転移酵素HEC-GlcNAc6ST遺伝子を発現する細胞に存在し、GlcNAc6ST-1又はI-GlcNAc6ST遺伝子を発現する細胞には存在しないか又は微量にしか存在しない抗原と特異的に反応することを特徴とする検査方法。

【請求項 2】

前記抗原が、GlcNAc-6-硫酸基転移酵素HEC-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞に存在し、GlcNAc6ST-1又はI-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞には存在しないか又は微量にしか存在しない請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】

前記抗原が下記一般式



(式中、R1は他の酵素群によって付加される糖残基であり特に構造は限定されない。Gal β は β ガラクトースを表し、GlcNAc β は β -N-アセチルグルコサミンを表し、Gal β 1-3/4 は、Gal β の1位とGlcNAc β の3位及び/又は4位とが結合することを示し、(SO₃-6)はGlcNAc β の6位に硫酸基が付加していることを示し、R2は-3GalNAc α 、-3Gal β 又は-2Man α を表し、GlcNAc β の1位に結合する。) で表される糖鎖を有する請求項 1 又は 2 に記載の検査方法。

【請求項 4】

前記抗体がMECA-79抗体（ファーミンジェン社カタログ番号09961D）である請求項 1 ~ 3 に記載の検査方法。

【請求項 5】

被検者の組織、体液若しくは糞便又はこれらの抽出物に対する、MECA-79抗体又はこれの同等物の反応性を検査することから成る大腸癌及び大腸腺腫の検査方法。

【請求項 6】

前記抗体に標識を付したプローブを反応させ、この標識を定性的又は定量的に検出することから成る請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の検査方法。

【請求項 7】

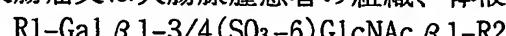
GlcNAc-6-硫酸基転移酵素HEC-GlcNAc6ST遺伝子を発現する細胞に存在し、GlcNAc6ST-1又はI-GlcNAc6ST遺伝子を発現する細胞には存在しないか又は微量にしか存在しない糖鎖を有する抗原と特異的に反応する抗体(但し、MECA-79抗体を除く。)。

【請求項 8】

GlcNAc-6-硫酸基転移酵素HEC-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞に存在し、GlcNAc6ST-1又はI-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞には存在しないか又は微量にしか存在しない糖鎖を有する抗原と特異的に反応する抗体(但し、MECA-79抗体を除く。)。

【請求項 9】

大腸癌又は大腸腺腫患者の組織、体液若しくは糞便中に存在し、下記一般式



(式中、R1は他の酵素群によって付加される糖残基であり特に構造は限定されない。Gal β は β ガラクトースを表し、GlcNAc β は β -N-アセチルグルコサミンを表し、Gal β 1-3/4 は、Gal β の1位とGlcNAc β の3位及び/又は4位とが結合することを示し、(SO₃-6)はGlcNAc β の6位に硫酸基が付加していることを示し、R2は-3GalNAc α 、-3Gal β 又は-2Man α を表し、GlcNAc β の1位に結合する。) で表される糖鎖を有する抗原と特異的に反応する抗体(但し、MECA-79抗体を除く。)。

【請求項 10】

MECA-79抗体又は請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体を主成分とする大腸癌及び大腸腺腫の検査薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】大腸癌及び大腸腺腫の検査方法

【技術分野】

【0001】

この発明は、ヒトの大腸癌及び大腸腺腫の検査方法、そのための抗体、及び検査薬に関する。

【背景技術】

【0002】

大腸癌患者は年々増加しており、早期発見のための検査方法が必要とされている。現在、大腸癌の検査には便の免疫潜血反応や各種の腫瘍マーカーが利用されているが、いずれもその陽性率は満足出来るものではない。すなわち、大腸癌の検査のために用いられている便の免疫潜血反応検査の陽性率は50～60%であり、大腸癌の腫瘍マーカーとしては癌胎児性蛋白(carcino-embryonic antigen, CEA)、CA19-9、STXなどがあり治療効果の判定や再発のモニターとして用いられているが、早期大腸癌の発見に関して十分な腫瘍マーカーであるとはいえない。

【0003】

脾曲部を境として大腸を右半と左半とに分けると、右半大腸癌は、広汎に大腸癌患者の検診に用いられている抗ヘモグロビン抗体を用いた便潜血検査で偽陰性となることが多いので、とくに右半大腸癌の早期診断率の上昇に貢献する検査法の開発が待たれている。大腸癌の発生母地とされる大腸腺腫の検体診断に至っては現在なお適切なものがなく、もっぱら内視鏡検査に頼らなければならない現状である。簡便な検査法で大腸腺腫の診断が可能になれば、内視鏡検査をすべきかどうかの振り分けに役立ち、大腸癌の早期発見に資すると考えられる。

【0004】

正常大腸においては糖鎖の硫酸化がさかんであるが、大腸癌においては、糖鎖の硫酸化は顕著に低下することが知られており、大腸に多いガラクトースの3'-硫酸化も、あるいはN-アセチルグルコサミン(以下「GlcNAc」という。)の6-硫酸化も減少する(非特許文献1)。患者大腸癌組織及び非癌大腸組織においてGlcNAc-6-硫酸基転移酵素の多数のアイソザイムが知られているが、そのなかでI-GlcNAc6STは癌化にともなって顕著に減少するため、大腸癌における糖鎖の硫酸化の顕著な低下が説明される(非特許文献2)。他方、非癌大腸のアイソザイムのひとつであるGlcNAc6ST-1は、癌化にともなって量的に顕著な変化を示さない。さらに、他のアイソザイムであるHEC-GlcNAc6STは癌で顕著に増加する(非特許文献3)。

【0005】

癌で増加するHEC-GlcNAc6STは6-硫酸化GlcNAcを合成するが、この酵素はいろいろな糖鎖中のGlcNAcを硫酸化するので、実際に細胞内で合成される糖鎖の構造と抗原性はきわめて多様である。一方、GlcNAc6ST-1やI-GlcNAc6STも6-硫酸化GlcNAcを合成するため、6-硫酸化GlcNAcがHEC-GlcNAc6STにより合成されるというだけでは、癌の特異的診断に用いることができない。

しかし、GlcNAc6ST-1及びI-GlcNAc6STの基質特異性はHEC-GlcNAc6STよりも狭いことが判明している(非特許文献3, 4)。このため、GlcNAc6ST-1やI-GlcNAc6STあまり合成されず、HEC-GlcNAc6STだけが合成できる6-硫酸化糖鎖が存在する可能性が強く示唆されるが、今まで大腸癌を診断できるような具体的な系は作られてはいなかった。

【0006】

一方、リンパ球の免疫学的ホーミングリセプターに対する抗体として市販されているモノクローナル抗体(MECA-79抗体)(非特許文献5)が化学合成品のGlcNAc-6-硫酸化糖鎖と反応することが知られている(非特許文献6)。更に、マウスのHEC-GlcNAc6ST酵素を、CHO細胞(ハムスターの卵巣の細胞)に遺伝子導入すると、細胞表面にこの抗体(MECA-79)が認識する抗原が出現することが報告されている(非特許文献7)。しかし、ヒトの癌細胞においてこのMECA-79抗体が認識する抗原が存在しているかどうかについては知られて

いなかった。

【0007】

- 【非特許文献1】 Izawa, M. et al., Cancer Res., 60: 1410-1416, 2000
- 【非特許文献2】 第22回日本分子腫瘍マーカー研究会講演予稿集, pp. 42-43, 2002
- 【非特許文献3】 Seko, A. et al., Glycobiology, 10: 919-929, 2000
- 【非特許文献4】 Seko, A. et al., Glycobiology, 12: 379-388, 2002
- 【非特許文献5】 Streeter, P.R. et al., J. Cell Biol. 107: 1853-1862, 1988
- 【非特許文献6】 Bruehl, R.E. et al., J. Biol. Chem. 275: 32642-32648, 2000
- 【非特許文献7】 Yeh, J.C. et al., Cell 105: 957-969, 2001

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、高率で大腸癌患者及び大腸癌の危険度の高い患者を検出することができる大腸癌及び大腸腺腫の診断に役立つ検査方法及び検査薬を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者等は検討の結果、糖鎖硫酸化酵素GlcNAc-6-硫酸基転移酵素のアイソザイムの分布に非癌大腸組織と大腸癌及び大腸腺腫組織との間で顕著な差異があることを見出し、GlcNAc6ST-1やI-GlcNAc6STあまり合成されず、HEC-GlcNAc6STだけが合成できる6-硫酸化糖鎖を患者組織や糞便検体から検出することにより大腸癌及び大腸腺腫を特異的に検出できることを明らかにした。

従来GlcNAc-6-硫酸化糖鎖と反応する抗体として、AG223 (Biochem. (Tokyo), 124: 670-678, 1998)、G152, G72, AG97, AG107, AG273, G2706, G27011, G27039 (以上、J. Biol. Chem., 273: 11225-11233, 1998)等多数が知られている。一方、リンパ球の免疫学的ホーミングリセプターに対する抗体として市販されているMECA-79抗体（ファーミンジェン社製カタログ番号09961D、ベクトン・ディッキンソン社販売）もまた何らかのGlcNAc-6-硫酸化糖鎖と反応することが知られている（非特許文献6）。これらの抗体のうち、正常大腸上皮細胞に見られるGlcNAc-6-硫酸化糖鎖をよく発現する細胞とは反応性が弱いかあるいは皆無であり、癌で増加するGlcNAc-6-硫酸化糖鎖をよく発現する細胞との反応性が高い抗体を求めてスクリーニングし、得られた抗体を患者由来の検体を対象に用いて検索したところ、大腸癌に高率に陽性となることが判明し、本発明を完成させるに至った。

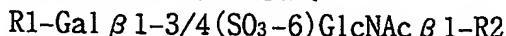
【0010】

即ち、本発明は、被検者の組織、体液若しくは糞便又はこれらの抽出物に対する抗体の反応性の有無又は反応強度を検査することから成る大腸癌及び大腸腺腫の検査方法であって、該抗体が、GlcNAc-6-硫酸基転移酵素HEC-GlcNAc6ST遺伝子を発現する細胞に存在し、GlcNAc6ST-1又はI-GlcNAc6ST遺伝子を発現する細胞には存在しないか又は微量にしか存在しない抗原と特異的に反応することを特徴とする検査方法である。

この抗原は、GlcNAc-6-硫酸基転移酵素HEC-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞に存在し、GlcNAc6ST-1又はI-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞には存在しないか又は微量にしか存在しないものであってもよい。

【0011】

この抗原は下記一般式



(式中、R1は他の酵素群によって付加される糖残基であり特に構造は限定されない。Gal β は β ガラクトースを表し、GlcNAc β は β N-アセチルグルコサミンを表し、Gal β 1-3/4は、Gal β の1位とGlcNAc β の3位及び/又は4位とが結合することを示し、(SO₃-6)はGlcNAc β の6位に硫酸基が付加していることを示し、R2は-3GalNAc α 、-3Gal β 又は-2Man α を表し、GlcNAc β の1位に結合する。)で表される糖鎖を有する。

この抗体として、MECA-79抗体（ファーミンジェン社カタログ番号09961D、図6及び図7に示す。）が好ましい。

また、本発明は、被検者の組織、体液若しくは糞便又はこれらの抽出物に対する、MECA-79抗体又はこれの同等物の反応性を検査することから成る大腸癌及び大腸腺腫の検査方法である。

【0012】

また、本発明は、更にこの抗体に標識を付したプローブを反応させ、この標識を定性的又は定量的に検出することから成る上記いずれかの検査方法である。

好ましい検査方法は、患者の組織、体液若しくは糞便又はこれらの抽出物中に存在する抗原を支持体に固定し、これに抗体を反応させ、これに標識を付したプローブを反応させ、この標識を検出することから成る。各工程間に適宜洗浄工程を入れることが好ましい。このプローブとしては、抗ヒトIgG抗体、プロテインG、プロテインA、プロテインLなどが挙げられる。このプローブには通常標識を付す。この標識としては、放射性同位元素(125I)、酵素(ペルオキシダーゼ、アルカリフェオヌクターゼ)が挙げられる。酵素抗体を用いた場合には、基質を反応させてその変化(着色等)を観察すればよい。

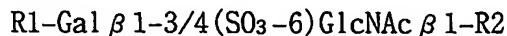
【0013】

また、本発明は、GlcNAc-6-硫酸基転移酵素HEC-GlcNAc6ST遺伝子を発現する細胞に存在し、GlcNAc6ST-1又はI-GlcNAc6ST遺伝子を発現する細胞には存在しないか又は微量にしか存在しない糖鎖を有する抗原と特異的に反応する抗体(但し、MECA-79抗体を除く。)である。

また、本発明は、GlcNAc-6-硫酸基転移酵素HEC-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞に存在し、GlcNAc6ST-1又はI-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞には存在しないか又は微量にしか存在しない糖鎖を有する抗原と特異的に反応する抗体(但し、MECA-79抗体を除く。)である。

【0014】

また、本発明は、大腸癌又は大腸腺腫患者の組織、体液若しくは糞便中に存在し、下記一般式



(式中、各記号は上記と同様である。)で表される糖鎖を有する抗原と特異的に反応する抗体(但し、MECA-79抗体を除く。)である。

更に、本発明は、MECA-79抗体を含むこれらいずれかの抗体を主成分とする大腸癌及び大腸腺腫の検査薬である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

GlcNAc6ST-1やI-GlcNAc6STあまり合成されず、HEC-GlcNAc6STだけが合成できる6-硫酸化糖鎖の構造は、一般式

R1-Gal β 1-3/4(SO₃⁻-6)GlcNAc β 1-R2
で表される。

【0016】

体内にはGlcNAc-6-硫酸化酵素が働く相手であるGlcNAc β は、様々な糖鎖担体に担われている。R2はその担体を示す。

我々及び他の研究者による研究から、HEC-GlcNAc6STはこれまで試されたすべてのGlcNAc β 1-R2に硫酸基を転移する能力を持つことが判明している(非特許文献4、7等)。これに対してGlcNAc6ST-1及びI-GlcNAc6STは、特定のR2部分を持つ場合のみ硫酸基を転移する能力を持つ。

HEC-GlcNAc6STが硫酸基を転移するが、GlcNAc6ST-1及びI-GlcNAc6STがあまり硫酸基を転移できないのは、R2が-3GalNAc α である場合(硫酸化後の構造はSO₃-6GlcNAc β 1-3GalNAc α となる)と、-3Gal β である場合(硫酸化後の構造はSO₃-6GlcNAc β 1-3Gal β となる)と、-2Man α である場合(硫酸化後の構造はSO₃-6GlcNAc β 1-2Man α となる)であることが判明している(J. Biol. Chem., 277: 3979-3984, 2002及びGlycobiology, 12: 379-388, 2002)。本発明の検査法においては、これら三者のいずれかに特異的な抗体を用いてもよいし、また三者の糖鎖のすべてと交叉反応する抗体でもよい。

【0017】

細胞内でGlcNAc-6-硫酸化酵素は、糖鎖末端のGlcNAcに硫酸基を付加して上記のように6-硫酸化GlcNAc(即ち、 SO_3^- -6GlcNAc)を合成する。しかし、糖鎖末端に6-硫酸化GlcNAcが生じた後にも、細胞内では他の酵素群によってさらにこれに糖残基(R1)が付加されるので、最終的に合成され細胞から產生される糖鎖の構造と抗原性は多種多様となる。通常6-硫酸化GlcNAcにまず付加される構造はGal β 1-4及びGal β 1-3である(Gal β 1-3/4と表記する)。さらにこれに加えて、NeuAc α 2-3/6、 SO_3^- -3/6、Fuc α 1-2/3/4が付加することが一般的に知られている。このR1部分はGlcNAc-6-硫酸化酵素による6-硫酸化GlcNAcの合成が終わったのちに、あとになって付加されるものである。このためR1部分はHEC-GlcNAc6S T、GlcNAc6ST-1やI-GlcNAc6STなどのGlcNAc-6-硫酸化酵素の基質特異性とは関わりがない。

【0018】

このような糖鎖を有する抗原は、大腸癌患者から生検あるいは外科手術で得られたがん組織や、それに由来する物質を含む血清・腹水・糞便などの検体に存在する。またこれから、この抗原をリン酸緩衝食塩水などで簡単に抽出することが出来る。またこの糖鎖抗原に対する抗体は公知の抗体産生技術(たとえばMethods in Enzymology, 312: 160-179, 2000; Methods in Molecular Biology, 199: 203-218, 2002など)を用いて得ることが出来る。

【0019】

本法で検出されるGlcNAc-6-硫酸化糖鎖は大腸癌のみならず大腸癌の発生母地とされる大腸腺腫にも陽性を示し、スクリーニング検査に用いることによって、内視鏡などの精査や経過観察を要する大腸腺腫患者群を検出できる。大腸癌のスクリーニング検査に現在よく用いられる抗ヘモグロビン抗体による潜血検査に比べて大腸腺腫の検出率が高い。また、本法で検出される6-硫酸化糖鎖は大腸を右半と左半とに分けるとともにともと右半大腸に多いため、上記の診断は右半大腸に出来た大腸癌及び大腸腺腫の診断にとくに有用と考えられる。右半大腸癌は、普通用いられている抗ヘモグロビン抗体を用いた便潜血検査で陽性に出ないことが多いので、本発明の方法を併用すれば、右半大腸癌の診断率の上昇に飛躍的に貢献すると考えられる。

以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

【0020】

まず、ヒト由来の大腸癌細胞株と正常大腸上皮細胞株についてRT-PCR法を用いてGlcNAc-6-硫酸化酵素アイソザイムの遺伝子発現をしらべた。

RT-PCR解析において、HEC-GlcNAc6ST遺伝子(Genebank AF131235)発現の検出用のPCRプライマーとしてupper strand側は配列番号1、lower strand側は配列番号2の合成オリゴヌクレオチドを用い($T_m=59^\circ\text{C}$)、GlcNAc6ST-1遺伝子(Genebank AB011451)発現検出用のプライマーとしてupper strand側は配列番号3、lower strand側は配列番号4の合成オリゴヌクレオチドを用い($T_m=62^\circ\text{C}$)、I-GlcNAc6ST遺伝子(Genebank AF176838)発現検出用のPCRプライマーとして、upper strand側は配列番号5、lower strand側は配列番号6の合成オリゴヌクレオチドを用いた($T_m=60^\circ\text{C}$)。

その結果を図1aに示す。HEC-GlcNAc6ST遺伝子を強く発現し、GlcNAc6ST-1及びI-GlcNAc6ST遺伝子をほとんど発現しない細胞として、COLO201細胞が典型的な大腸癌パターンを示す細胞であることが判明した。また、HEC-GlcNAc6ST遺伝子をほとんど発現せず、GlcNAc6ST-1及びI-GlcNAc6ST遺伝子を有意に発現する細胞として、SW480細胞をトリコスタチンA処理したTSA-SW480細胞が典型的な正常上皮パターンを示す細胞であることが判明した。

【0021】

次に、多数の抗6-硫酸化糖鎖抗体についてこの二種の細胞との反応性をスクリーニング

し、COLO201細胞とよく反応し、TSA-SW480細胞と反応しない抗体を探索した。

細胞と抗体との反応性のスクリーニングには間接蛍光抗体法（一次抗体 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 4°C 、30 min. 二次抗体はZymed Laboratories社のウサギ抗ラットIgM抗体、 4°C 、30 min.）で染色したのちにFACScan (Becton Dickinson社) にてフローサイトメトリー解析を行った。

典型的な解析結果を図1 b に示す。MECA-79抗体（ファーミンジョン社製カタログ番号09961D、ベクトン・ディッキンソン社販売）がCOLO201細胞とよく反応し、TSA-SW480細胞と反応性の低い抗体であり、大腸癌診断の検査に適した抗体であることが判明した。これに対して、対照として用いたG72抗体 (J. Biol. Chem. 273:11225-11233, 1998) はCOLO201細胞とTSA-SW480細胞の両方の細胞と有意に反応し、大腸癌診断の検査には適当でないことが分かる。

【実施例2】

【0022】

本実施例ではHEC-GlcNAc6ST遺伝子、GlcNAc6ST-1遺伝子、I-GlcNAc6ST遺伝子をそれぞれ導入した細胞を作成した。これらの細胞についてMECA-79抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

HEC-GlcNAc6STの遺伝子導入細胞の作成には遺伝子(Genebank AF131235)をpCDNA3.1ベクターに導入したものを用い、GlcNAc6ST-1の遺伝子導入細胞の作成には遺伝子(Genebank AB011451)をpIRES1hygroベクターに導入したものを用い、I-GlcNAc6STの遺伝子導入細胞の作成には遺伝子(Genebank AF176838)をpCDNA3.1ベクターに導入したもの用いた。フローサイトメトリー法は実施例1と同じ方法で行った。

結果を図2に示す。MECA-79抗体はHEC-GlcNAc6ST遺伝子導入細胞と極めて強く反応し、GlcNAc6ST-1遺伝子導入細胞やI-GlcNAc6ST遺伝子導入細胞とはごく弱くしか反応しなかった。

【実施例3】

【0023】

MECA-79抗体を用いて免疫組織学的染色で患者由来の大腸癌組織(31例)を染色した。免疫組織学的染色には、厚さ $10\mu\text{m}$ の凍結切片を用い、一次抗体として $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ のMECA-79抗体を用い、抗ラットIgM抗体を二次抗体とするベクター社の試薬キット(Vectastain)を会社の説明書通りに用いて行った。

その結果を図3に示す。本抗体は非癌大腸粘膜(N)には反応せず(31例中0例、0%)、癌組織(Ca)に31例中10例(32%)に反応が見られた。特に右半大腸に生じた癌に陽性率が比較的高く(60%)、左半大腸での陽性率は低かった(19%)。

【0024】

典型的な染色写真を図4に示す。

図4 aは、患者大腸癌組織(Ca)と非癌大腸組織(N)の染色写真を示す。癌組織で強く抗体に強く染まっていかず、非癌大腸組織はほとんど染まっていない。

図4 bは、同じ組織を、AG107抗体を用いて染めたものを示す。AG107抗体は通常のGlcNAc-6-硫酸化糖鎖一般と反応するため、aとは逆に癌組織(Ca)よりも非癌大腸組織(N)のほうがずっとよく抗体に染まっており、GlcNAc-6-硫酸化糖鎖というだけでは癌を特異的に検出することができないことを示している。即ち、大腸癌及び大腸腺腫に多い特定のGlcNAc-6-硫酸化糖鎖の分子種を検出するMECA-79のような抗体を用いたときにのみ特異的な検出が可能である。

図4 cは右半由来の大腸癌組織における発現例を示す。癌組織が強染しており、極めて強い発現があることがわかる。

図4 dは大腸腺腫性ポリープにおける発現を示す。Nは非腺腫大腸組織、Aは腺腫細胞を示す。Aで示す腺腫の部分がMECA-79抗体によってよく染まっている。癌でなくて腺腫性ポリープでも、MECA-79で検出されるGlcNAc-6-硫酸化糖鎖が多量に出現していることを示す。良性疾患でありながら大腸癌の発生母地とされる腺腫性ポリープを確実に検査できることが分かる。

【実施例4】

【0025】

本実施例では、大腸癌患者の糞便抽出液に対してMECA-79抗体を用いた酵素免疫測定によってほんとうに患者糞便中にこうしたGlcNAc-6-硫酸化糖鎖が出現しているかどうかを簡易な定性法により確認した。糖鎖抗原によっては糞便中細菌の分泌する酵素によって分解を受け、糞便中に検出されないおそれがあるためであり、この点の確認は本発明の実施可能性を考える上で重要である。

ヒト便0.1gを便抽出バッファー(10 mM PBS, 1% BSA, pH 7.5)1ml中に分散後、4℃、8000g、15分間遠心分離を行い、得られた上清40μLに同バッファー120μL加えサンプルとした。これをPVDF膜(Immobilon、ミリポア、Lot K2JN2659B)に吸引プロットし、非特異反応をブロックしたのち、MECA-79抗体、ウサギ抗ラットIgM抗体、POD標識-ヤギ抗ウサギIgG抗体、アビジン-ビオチン複合体溶液を順次反応させ、NTB基質液にて発色させた。

その結果を図5に示す。大腸癌症例8例中4例(50%)、大腸腺腫症例8例中4例(50%)に陽性であり、良性疾患では1例に弱い陽性を認めるのみで、健常人はほぼ全例陰性であった。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】大腸癌細胞株(COL0201細胞)と正常大腸上皮細胞株(トリコスタチンA処理したSW480細胞)について、MECA-79抗体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。aは、大腸癌細胞株(COL0201細胞)と正常大腸上皮細胞株(SW480細胞)の選定を示す。bは、抗6-硫酸化糖鎖抗体についてこの2種の細胞との反応性のフローサイトメトリー法による解析結果を示す。縦軸は細胞頻度(細胞個数)、横軸は蛍光強度(Arbitrary Unit)を表す。

【図2】HEC-GlcNAc6ST遺伝子、GlcNAc6ST-1遺伝子、I-GlcNAc6ST遺伝子を導入した細胞について、フローサイトメトリー法によるMECA-79抗体との反応性を示す図である。縦軸は細胞頻度(細胞個数)、横軸は蛍光強度(Arbitrary Unit)を表す。

【図3】MECA-79抗体を用いた患者大腸癌組織の染色写真を示す図である。Caは癌組織、Nは非癌大腸組織を示す。

【図4】患者大腸癌組織と非癌大腸組織についてMECA-79抗体を用いた染色写真を示す図である。a～cにおいて、Caは癌組織、Nは非癌大腸組織を示す。dにおいて、Nは非腺腫大腸組織、Aは腺腫細胞を示す。黒い部分(カラーでは焦げ茶色)は、抗体で認識される抗原が存在することを示し、灰色部分(カラーでは薄い青色)は、メチレンブルーによる対照染色を示す。

【図5】患者糞便抽出物中のMECA-79抗体の反応性を示す図である。上から各列は大腸癌症例8例、大腸腺腫症例8例、良性疾患8例、健常人8例の成績を示す。

【図6】MECA-79抗体(ファーミンジエン社カタログ番号09961D)のカタログを示す図である。

【図7】MECA-79抗体(ファーミンジエン社カタログ番号09961D)のカタログを示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 大腸癌及び大腸腺腫の検査方法

<130> PS03-1308

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

gcagcatgag cagaaactca ag

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

tccaggtaga cagaagatcc ag

22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

atgcaatgtt cctggaaggc

20

<210> 4

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
ttgatgttgt tctccaggaa g

21

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
caagacagtg acagtgcctcc

20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

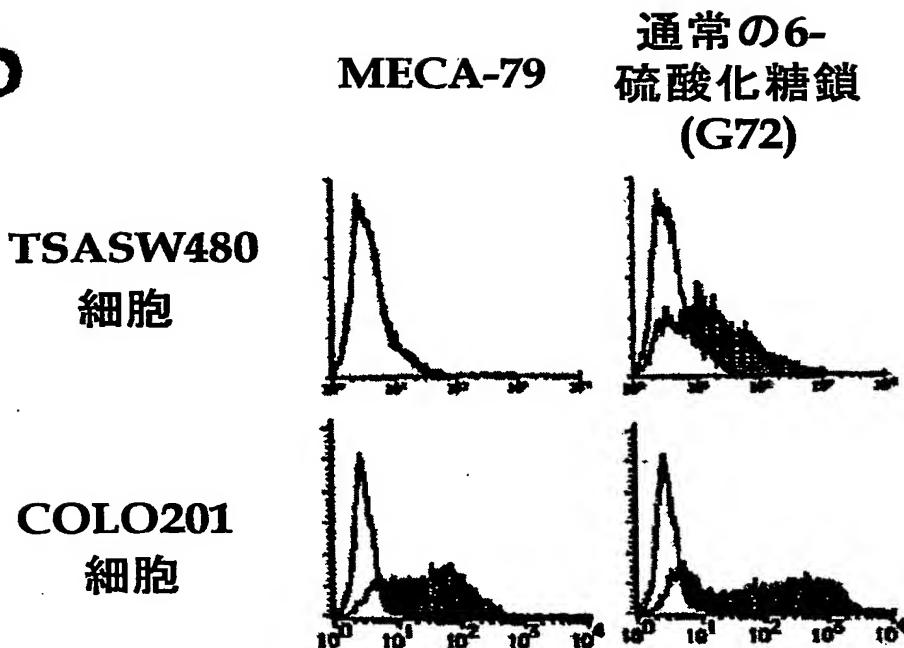
<400> 6
tacgtcctgc ttgctgatgg

20

【書類名】図面
【図 1】

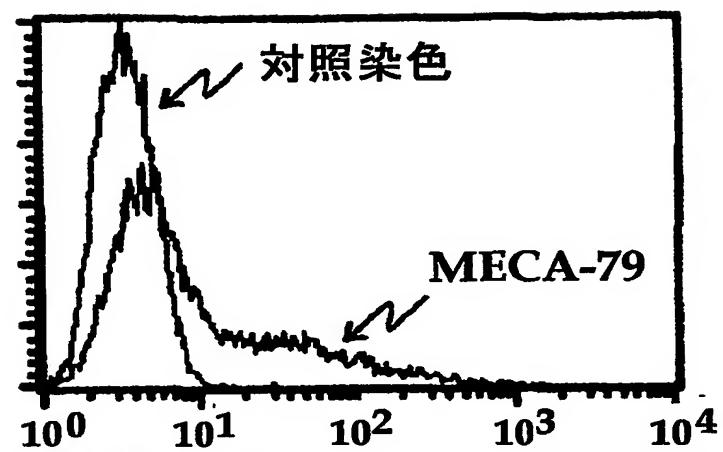
a

PDF AVAILABLE UPON

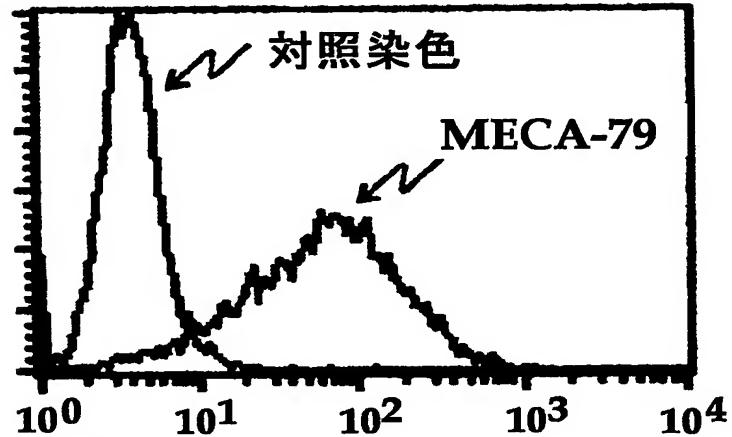
b

【図2】

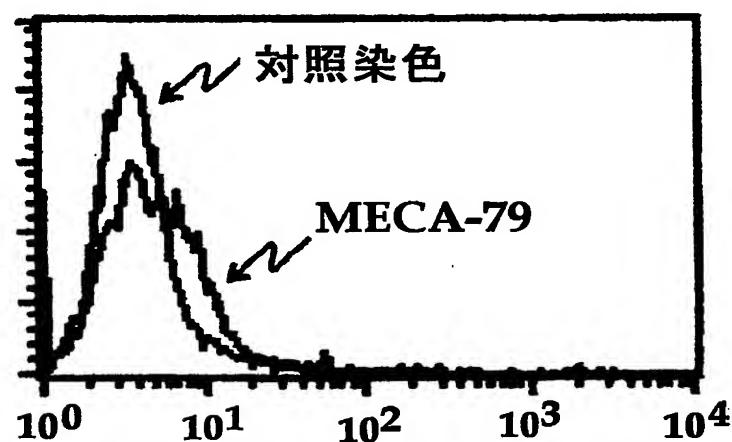
**GlcNAc6ST-1
導入細胞**



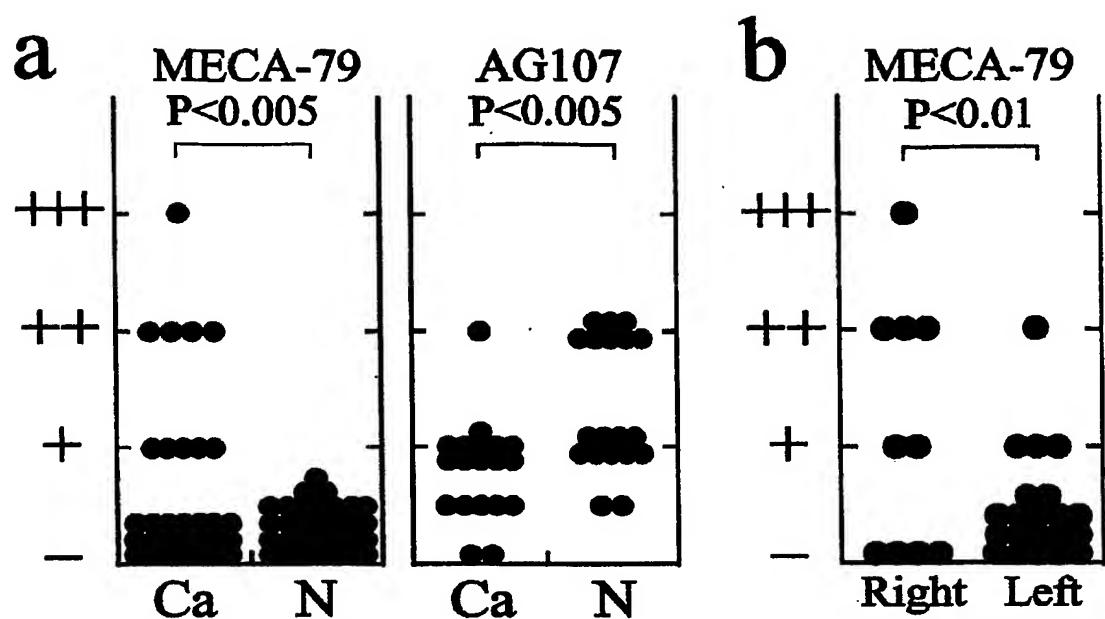
**HEC-
GlcNAc6ST
導入細胞**



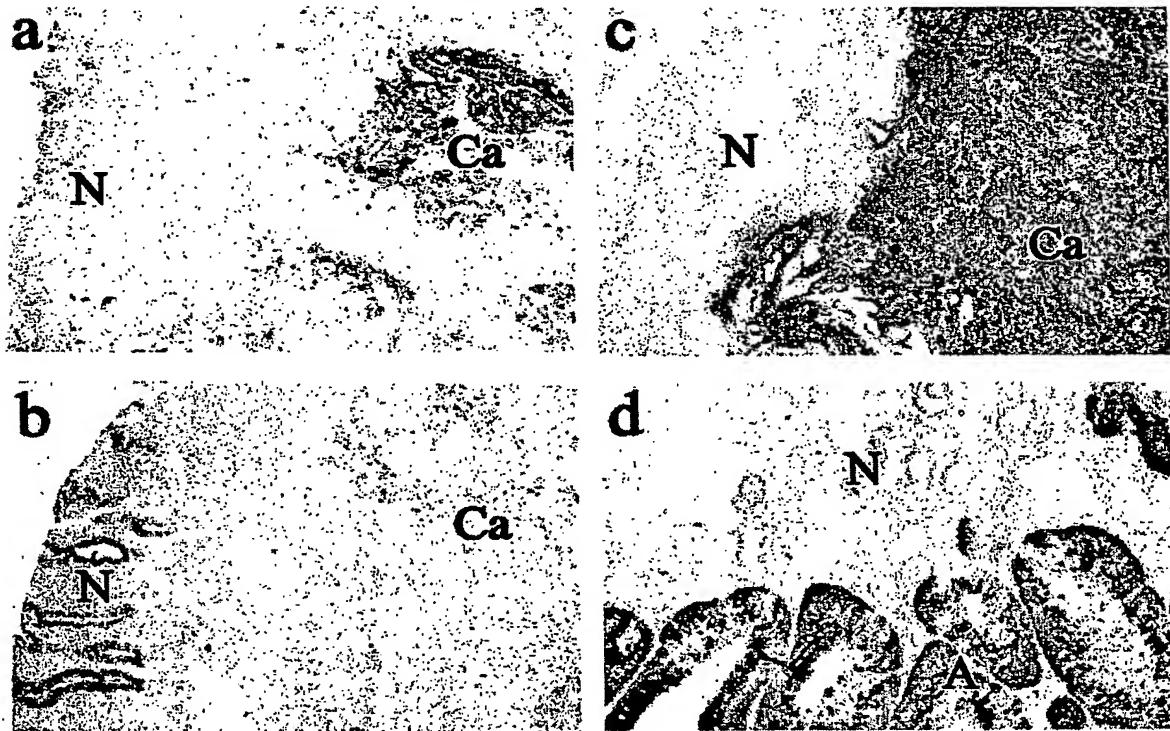
**I-GlcNAc6ST
導入細胞**



【図3】



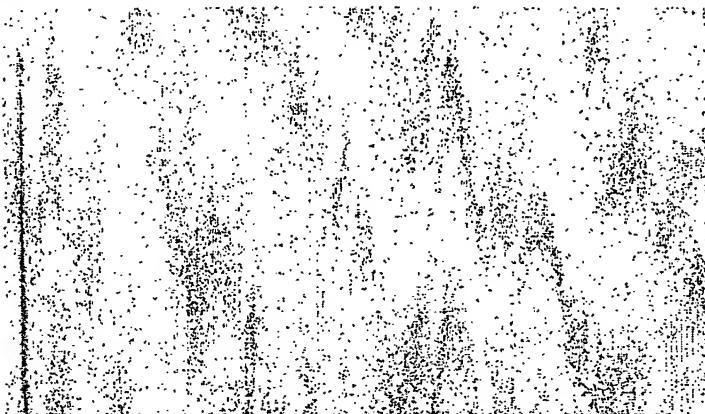
【図4】



【図5】

検体

No. 1 2 3 4 5 6 7 8



- ←大腸癌(8例)
- ←大腸腺腫(8例)
- ←良性大腸疾患(8例)
- ←健常人(8例)

BEST AVAILABLE COPY

【図6】

BD PharMingen Technical Data Sheet

Page 1 of 2

PURIFIED RAT ANTI-MOUSE PNAd CARBOHYDRATE EPITOPE (CD62L Ligand) MONOCLONAL ANTIBODY**PRODUCT INFORMATION**

Catalog Number:	553863 (Was: 09961D), 0.5 mg
Description:	Purified anti-mouse PNAd Carbohydrate Epitope (CD62L Ligand)
Clone:	MECA-79
Immunogen:	Collagenase-dispersed BALB/c lymph node stroma ¹
Isotype:	Rat (Wistar) IgM, κ
Contents:	Purified immunoglobulin in 10 mM phosphate buffer, pH 7.2 with 500 mM NaCl and 0.09% (w/v) sodium azide.

SPECIFICITY

The MECA-79 antibody reacts with sulfate-dependent carbohydrate epitopes of peripheral lymph node addressin (PNAd).² The MECA-79-reactive antigen is closely associated with the carbohydrate ligands for L-selectin (e.g., CD34, GlyCAM-1, MaDCAM-1), which are expressed on high endothelial venules (HEV) in lymphoid tissues and at sites of chronic inflammation.^{1,2,3,4,5,6} Cross-reactivity with human,^{3,4} ovine,⁷ bovine,⁷ primate,⁷ and porcine⁸ tissues has been observed. MECA-79 antibody inhibits L-selectin-dependent lymphocyte and platelet homing to lymph nodes *in vivo*^{1,9} and *in vitro* adhesion to lymphoid tissue HEV^{1,4} and immobilized PNAd.^{3,9,10}

PREPARATION AND STORAGE

The antibody was purified from tissue culture supernatant by affinity chromatography. The antibody solution should be stored undiluted at 4°C.

USAGE

This antibody has been tested by immunohistochemical staining (IHC) of citrate-pretreated formalin-fixed paraffin-embedded sections (5 - 20 µg/ml) to assure specificity and reactivity. Other reported applications include IHC of acetone-fixed frozen sections,^{1,4,5} immunoprecipitation^{2,3} western blot analysis,¹⁰ and *in vitro* and *in vivo* adhesion blocking.^{1,3,4,9,10} Since applications vary, each investigator must determine dilutions appropriate for individual use.

Caution: Sodium azide is a reversible inhibitor of oxidative metabolism; therefore, antibody preparations containing this preservative agent must not be used in cell cultures nor injected into animals. Sodium azide may be removed by washing stained cells or plate-bound antibody or dialyzing soluble antibody in sodium azide-free buffer. Since endotoxin may also affect the results of functional studies, we recommend the NA/LE™ (No Azide/Low Endotoxin) antibody format for *in vitro* and *in vivo* use.

REFERENCES

1. Streeter, P.R., B.T.N. Rouse, and E.C. Butcher. 1988. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J. Cell Biol.* 107: 1853 - 1862.
2. Hemmerich, S., E.C. Butcher, and S.D. Rosen. 1994. Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, an adhesion-blocking monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 180: 2219 - 2226.
3. Berg, E.L., M.K. Robinson, R.A. Warnock, and E.C. Butcher. 1991. The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J. Cell Biol.* 114: 343 - 349.
4. Michie, S.A., P.R. Streeter, P.A. Bolt, E.C. Butcher, and L.J. Picker. 1993. The human peripheral lymph node vascular addressin. An inducible endothelial antigen involved in lymphocyte homing. *Am. J. Pathol.* 143: 1688 - 1698.
5. Faveeuw, C., M.-C. Gagnerault, and F. Lepault. 1994. Expression of homing and adhesion molecules in infiltrated Islets of Langerhans and salivary glands of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 152: 5969 - 5978.

Please see Page 2.

BD Biosciences www.bdbiosciences.com

Biometric Imaging
Clontech

Immunocytometry Systems
Labware

Transduction Laboratories
PharMingen

Asia Pacific:	Brazil	Canada	Europe	Europe	Japan	Mexico	United States
Tel (65) 6510 6533	Tel (55) 11 5185 9833	Tel 800.259.0197	BD Biosciences	Life Science Research	Tel (01) 3 5413 6251	Tel (525) 237 1200	Tel 877.232.8995
Fax (65) 6501 590	Fax (55) 11 5185 9834	Fax 905.542.9391	Tel (32) 53 720 211	Tel (49) 6221 305 521	Fax (51) 3 5413 6155	Fax (525) 237 1203	Fax 858.412.6338
		canada@bd.com	Fax (32) 53 720 450	Fax (49) 6221 305 521			



553863-09961D TDS
Rev.004 8/00

【図7】

REFERENCES (Continued)

6. Maly, P., A.D. Thall, B. Petryniak, C.E. Rogers, P.L. Smith, R.M. Marks, R.J. Kelly, K.M. Gersten, G. Cheng, T.L. Saunders, S.A. Camper, R.T. Camphausen, F.X. Sullivan, Y. Isogai, O. Hindsgaul, U.H. von Andrian, and J.B. Lowe. 1996. The $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86: 643 - 653.
7. Butcher, E.C. Personal communication.
8. Binns, R.M., A. Whyte, S.T. Licence, A.A. Harrison, Y.T.M. Tsang, D.O. Haskard, and M.K. Robinson. 1996. The role of E-selectin in lymphocyte and polymorphonuclear cell recruitment into cutaneous delayed hypersensitivity reactions in sensitized pigs. *J. Immunol.* 157: 4094 - 4099.
9. Diacovo, T.G., K.D. Puri, R.A. Warnock, T.A. Springer, and U.H. von Andrian. 1996. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science* 273: 252 - 255.
10. Puri, K.D., E.B. Finger, G. Gaudernack, and T.A. Springer. 1995. Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J. Cell Biol.* 131: 261 - 270.

For Research Use Only. Not For Diagnostic or Therapeutic Use.

Conditions: BD PharMingen will not be responsible for violations or patent infringements which may occur with the use of our products.

Hazardous Ingredient: Sodium Azide. Avoid exposure to skin and eyes. Ingestion, and contact with heat, acids, and metals. Wash exposed skin with soap and water. Flush eyes with water. Dilute with running water before discharge into plumbing.

BD Biosciences www.bd-biosciences.com

Biometric Imaging
Clontech

Asia Pacific
Tel (65) 6610 6333
Fax (65) 6601 5900

Brazil
Tel (55) 11 5185 9333
Fax (55) 11 5185 9334

Canada
canada@bd.com

Immunocytometry Systems
Labware

Europe
Tel 800.250.0187
Fax 905.542.9393

Europe
Tel (02) 53 720 211

Fax (02) 53 720 450

Transduction Laboratories
PharMingen

Japan
Tel (011) 3 5413 8051
Fax (011) 3 5413 8155

Mexico
Tel (525) 237 1200

Fax (525) 237 1200

United States

Tel 877.232.8993

Fax 858.812.8980



513853-00001D-TDS
Rev.004 8/00

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 高率で大腸癌患者及び大腸癌の危険度の高い患者を検出することができる大腸癌及び大腸腺腫の診断に役立つ検査方法及び検査薬を提供する。

【解決手段】 糖鎖硫酸化酵素GlcNAc-6-硫酸基転移酵素のアイソザイムの分布に非癌大腸組織と大腸癌及び大腸腺腫組織との間で顕著な差異があることを見出し、これを応用することによって一定範囲のGlcNAc-6-硫酸化糖鎖群を患者組織や糞便検体から検出すことにより大腸癌及び大腸腺腫を特異的に検出できることを明らかにした。大腸癌及び大腸腺腫組織に存在する酵素により特異的に生成されるGlcNAc-6-硫酸化糖鎖と反応するM ECA-79抗体（ファーミンジエン社製カタログ番号09961D、ベクトン・ディッキンソン社）を用いれば大腸癌及び大腸腺腫の検査ができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-296216
受付番号	50301369183
書類名	特許願
担当官	金井 邦仁 3072
作成日	平成15年 8月22日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 8月20日
-------	-------------

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】 特願2003-296216
【承継人】
 【識別番号】 503360115
 【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
 【代表者】 沖村 憲樹
 【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
 【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
 【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
 【物件名】 登記簿謄本 1
 【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-296216

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 科学技術振興事業団

特願 2003-296216

出願人履歴情報

識別番号 [000116622]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市中区三の丸3丁目1番2号
氏 名 愛知県

2. 変更年月日 2004年 1月20日

[変更理由] 住所変更

住 所 愛知県名古屋市中区三の丸三丁目1番2号
氏 名 愛知県

特願 2003-296216

出願人履歴情報

識別番号 [000252300]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

氏名 和光純薬工業株式会社

特願 2003-296216

出願人履歴情報

識別番号 [503360115]

1. 変更年月日 2003年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏名 独立行政法人 科学技術振興機構